

## ⑫ 公開特許公報 (A)

昭56-39782

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 12 N 9/96  
// A 61 K 37/48

識別記号

庁内整理番号  
7421-4B  
6617-4C

⑭ 公開 昭和56年(1981)4月15日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 4 頁)

## ⑮ トロンビンの安定化方法

⑯ 特 願 昭54-112454

⑰ 出 願 昭54(1979)9月4日

⑱ 発 明 者 須賀和男

東京都墨田区業平5丁目5番12  
号第一化学薬品株式会社東京研  
究所内

⑲ 発 明 者 牧明道

東京都墨田区業平5丁目5番12  
号第一化学薬品株式会社東京研  
究所内

⑳ 発 明 者 日比野貢

東京都中央区日本橋3丁目13番  
5号第一化学薬品株式会社内

㉑ 発 明 者 横島徹喜

東京都墨田区業平5丁目5番12  
号第一化学薬品株式会社東京研  
究所内

㉒ 出 願 人 第一化学薬品株式会社

東京都中央区日本橋三丁目13番  
5号

㉓ 代 理 人 里見和幸

## 明 細 書

## 1 発明の名称

トロンビンの安定化方法

## 2 特許請求の範囲

一価あるいは多価の水溶性有機カルボン酸塩  
類から選ばれた化合物の一種類または二種類以  
上を組合せて添加することを特徴とするトロン  
ビン溶液の安定化方法

## 3 発明の詳細な説明

本発明はトロンビン溶液の安定化方法に関す  
るものである。

さらに詳細には一価あるいは多価の水溶性有  
機カルボン酸塩類から選ばれた化合物の一種類  
または二種類以上を組合せて添加することを特  
徴とするトロンビン溶液の安定化方法を提供す  
るものである。

トロンビンはフィブリノーゲンに作用して、  
フィブリンを生成することによつて血液凝固作  
用を生じるので外科領域において局所止血剤と  
して使用されている薬剤である。またアンチト

ロンビンあるいはプロトロンビンの測定に広く  
使われる重要な酵素であり、これらの測定は血  
栓症、各種炎症及び肝臓病の診断に有効なもの  
である。

しかし、トロンビンは溶液状態においては非  
常に不安定であるため通常凍結乾燥品として保  
存し、用時溶解して直ちに使用する必要がある。

(John W. Fenton, David L. Aronson 等, J. Biol. Chem.,  
252巻, 3587頁, 1977年)

そのため特に臨床検査においては使用に際し  
少量ずつ溶解調製し且つ低温に保存したり、あ  
るいはアルブミンを添加して安定性の増加をは  
かつたりしているが、いずれも満足し得るもの  
ではなく、いわんや最近の臨床検査における自  
動分析機用試薬の如く事前に調整された試液を  
分析機にセットして連続長時間分析する場合に  
は、その間にトロンビン力価の低下はまぬがれ  
ず、全く使用し難いものである。そこで本発明  
者らはこれら欠点を克服すべくトロンビン溶液  
の安定化方法について鋭意研究を重ねた結果、

一価あるいは多価の水溶性有機カルボン酸塩類の添加がその安定化に非常に有効であることを見出し、本発明を完成した。

本発明に使用できる安定化剤としては一価あるいは多価カルボン酸、即ち酢酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸、癸酸、マロン酸、コヘク酸等、一価あるいは多価のハイドロキシカルボン酸即ち乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、グルクロン酸、グルコン酸、グリコール酸等の塩類が有効であるが、通常入手容易な塩類例えばクエン酸ナトリウム、酒石酸ナトリウム・カリウム、グルコン酸ナトリウム、リンゴ酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、コヘク酸カリウム等を選択してその一種類あるいは二種類以上を適宜組合せて使用することができる。なお選択された塩類の水溶液は弱アルカリ性が好ましく、多くの場合はpH 7〜9であるからそのまま使用できるが、pH 7〜9を著るしくはされる場合はあらかじめ水酸化ナトリウムあるいは塩酸で調整する必要がある。

- 3 -

ことができる方法であり、公知のアルブミン添加トロンビンと本発明の安定化剤添加トロンビンについて安定性を比較した結果を表-1及び表-2に示す。

表-1 37℃におけるヒトトロンビン溶液の安定性試験結果

安定化剤	時間	調製時	1時間	2時間	4時間	6時間	8時間
0.1%牛アルブミン	100%	100%	31%	27%	23%	20%	18%
25%クエン酸ナトリウム・2H <sub>2</sub> O	100	98	100	95	98	99	
25% - カリウム・H <sub>2</sub> O	100	98	98	101	102	99	
25%酒石酸ナトリウム・カリウム・4H <sub>2</sub> O	100	100	100	101	101	103	
25% - カリウム・4H <sub>2</sub> O	100	100	101	99	101	100	
25%グルコン酸ナトリウム	100	100	104	100	98	102	
25% - カリウム	100	99	96	93	90	87	
25%リンゴ酸ナトリウム・2H <sub>2</sub> O	100	99	99	99	99	103	
25%酢酸ナトリウム・3H <sub>2</sub> O	100	99	98	98	97	99	
25%コヘク酸カリウム・3H <sub>2</sub> O	100	99	97	98	98	98	

(トロンビン活性: 0.625 U/ml)

- 3 -

特開昭56- 39792(2)

本発明を実施するに当つては上記の如く選択された有機カルボン酸塩類をトロンビンの溶解用液にあらかじめ添加しておくか、トロンビンの溶解と同時に添加された状態になるように凍結乾燥トロンビンにあらかじめ混合しておいてもよい。

なお、安定化剤の使用量は調製されるトロンビン溶液に対し1%以上必要で、5%以上あれば充分である。即ちトロンビン溶解液中の安定化剤の濃度としては1〜30%の範囲が好ましい。30%以上の濃度でもトロンビンは安定であるが、診断用試薬として用いる場合、塩濃度が高くなるため反応を阻害する恐れが生じ好ましくない。一方1%以下の場合には安定化剤の効果が少く実用的でない。

なお、本発明はヒト、牛、馬等の哺乳動物の血漿より得られる種々の品質のトロンビン溶液の安定化に適用可能である。

以上の様に本発明は簡単な操作で各種哺乳動物由来のトロンビン溶液の安定化を達成させる

- 4 -

表-2 37℃における牛トロンビン溶液の安定性試験結果

安定化剤	時間	調製時	1時間	2時間	4時間	6時間	8時間
0.1%牛アルブミン	100%	100%	95%	89%	80%	74%	67%
25%クエン酸ナトリウム・2H <sub>2</sub> O	100	100	102	102	102	98	98
25% - カリウム・H <sub>2</sub> O	100	101	98	99	99	100	
25%酒石酸ナトリウム・カリウム・4H <sub>2</sub> O	100	102	99	98	99	99	
25% - カリウム・4H <sub>2</sub> O	100	99	98	100	99	99	
25%グルコン酸ナトリウム	100	100	100	102	98	97	
25% - カリウム	100	100	99	98	97	97	
25%リンゴ酸ナトリウム・2H <sub>2</sub> O	100	100	101	101	99	100	
25%酢酸ナトリウム・3H <sub>2</sub> O	100	102	101	99	99	98	
25%コヘク酸カリウム・3H <sub>2</sub> O	100	100	100	101	99	100	

(トロンビン活性: 0.50 U/ml)

表-1及び2は調製時のトロンビン活性を100%としてその経時変化を%で示したものであり、本発明の安定化剤の添加により完全に経時変化が防止されている。

以上の如く本発明は有機カルボン酸塩類の添

- 4 -

記の如く選択  
ンビンの溶解  
・トロンビン  
なるように復  
合しておいて

されるトロン  
5%以上あれ  
液中の安定  
性が好まし  
は安定で  
合、塩濃度  
が生じ好ま  
定化剤の効

有乳動物の  
ンビン溶液

と凝乳動物  
と成させる

溶液の安

6時間	8時間
74%	67%
98-	98-
99-	100-
99-	99-
99-	99-
98-	97-
97-	97-
99-	100-
99-	98-
99-	100-

性を

たもの  
完全に

頭の高

加によりトロンビン溶液の安定化を達成させる  
方法であり、特に臨床検査用トロンビン溶液の  
安定化による自動分析機用トロンビン試薬溶液  
の実用化を可能にした有用な発明である。

次に実施例をもつて詳細に説明する。

#### 実施例1

クエン酸ナトリウム ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 12.5  
gを秤量し、300 mlのメスフラスコに秤量し  
たクエン酸ナトリウムを移し、傾斜まで蒸留水  
を加え混合して完全に溶解する。次にヒトト  
ロンビン (凍結乾燥品、250単位/バイアル、  
シグマ社製) 1バイアルを先に調製したクエン  
酸ナトリウム溶液400 mlを用いて完全に溶解  
しトロンビン溶液を調製する。(トロンビン活  
性: 0.625 U/ml) このトロンビン溶液を  
37℃の恒温槽に静置させ、経時的にトロンビ  
ン活性を次の様にして測定した。

#### A 試薬の調製

##### a 緩衝液

トリスヘイドロオキシメチルアミノメタ

- 7 -

(凍結乾燥品、50単位/バイアル、オーソ社  
製) 1バイアルを先に調製した酒石酸カリウム  
溶液80 mlを用いて完全に溶解しトロンビン溶  
液を調製する。(トロンビン活性: 0.625単  
位/ml) このトロンビン溶液を37℃の恒温  
槽に静置させ、実施例1と同様に経時的にト  
ロンビン活性を測定する。

#### 実施例3

クエン酸ナトリウム ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 7.5 g  
を秤量し、300 mlのメスフラスコに秤量した  
クエン酸ナトリウムを移し、傾斜まで蒸留水  
を加えて混合し完全に溶解する。次に牛トロン  
ビン (凍結乾燥品、5000単位/バイアル、バ  
ークデビス社製) 1バイアルを先に調製した  
クエン酸ナトリウム溶液100 mlを用いて完全  
に溶解し、一次トロンビン希釈液を調製する  
(トロンビン活性: 50単位/ml)。ついで一  
次トロンビン希釈液1 mlを100 mlのメスフラ  
スコにとり、調製したクエン酸ナトリウム溶液  
を傾斜まで加えて希釈する(トロンビン活性:

ン6.1 g, EDTA  $2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2.8 g, 塩化  
ナトリウム14.6 gを適当量の蒸留水で溶解  
させた後、稀塩酸でpH 8.4に調整する。  
次に本溶解液を1000 mlのメスフラスコ  
に移し、傾斜まで蒸留水を加える。

#### b 基質液

トロンビン測定用合成基質 (S-2238,  
テストチーム<sup>®</sup>, 第一化学薬品株式会社発売)  
25 mgを蒸留水140 mlで溶解し、基質液  
とする。

#### B トロンビン活性の測定

緩衝液350 μl, トロンビン溶液200 μl  
及び基質液300 μlを加え、ただちにギルフ  
ォード3000分光光度計にて波長405 nm  
における吸光度変化 ( $\Delta \text{Abs}/\text{min}$ ) を測定する。

#### 実施例2

酒石酸カリウム ( $\text{K}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 2.5 gを秤  
量し、100 mlのメスフラスコに秤量した酒石  
酸カリウムを移し、傾斜まで蒸留水を加え、混  
合して完全に溶解する。次にヒトトロンビン

- 8 -

0.5単位/ml)。このトロンビン溶液 (0.5単  
位/ml) を37℃の恒温槽に静置させ、経時的  
にトロンビン活性を実施例1と同様に測定する。

#### 実施例4

安定化トロンビン試液を用い自動分析機によ  
る血漿中アンチトロンビン活性の測定

#### A 試薬の調製

##### a 緩衝液

トリスヘイドロオキシメチルアミノメタ  
ン6.1 g, EDTA  $2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2.8 g, 塩化ナ  
トリウム14.6 gを適当量の蒸留水で溶解  
させた後、希塩酸でpH 8.4に調整する。  
次に本溶解液にヘパリン溶液 (10000  
単位/100 ml/バイアル、扶桑薬品社製)  
3 mlを加えた後、1000 mlのメスフラス  
コに移し傾斜まで蒸留水を加える。

#### b 基質液

トロンビン測定用合成基質 (S-2238,  
第一化学薬品株式会社発売) 25 mgを蒸留  
水140 mlで溶解し、基質液とする。

○安定化ヒトロンビン試液の調整

ヒトロンビン(50単位/バイアル、  
オーソ社製)1バイアルを5%酒石酸カリ  
ウムナトリウム( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )溶液  
80mlを用いて完全に溶解し、ロンビン  
試液とする(ロンビン活性:0.625単  
位/ml)。

△正常血漿の標準希釈系列(標準液)

正常血漿(テストチーム<sup>®</sup> アンチトロ  
ンビンキット、第一化学薬品株式会社発売)  
のを100%として、25%から125%  
までの希釈系列を作成する。

B日立706自動分析機による測定法

日立706自動分析機に前記緩衝液、基質  
液および安定化ロンビン試液をセフトし、  
自動分析機の作動が安定したのち第1図に示  
す作動ダイヤグラムによつて34検体を連続  
分析した。

○相関性の測定

第1図の日立706自動分析機のダイヤグ

- 11 -

ラムに基づき波長415nm~505nmの二  
波長における吸光度変化量を自動測定すると  
ともに現在市販されている用手法キット(テ  
ストチーム<sup>®</sup> アンチトロニンキット、第一  
化学薬品株式会社発売)でも測定を行ない比  
較した。34検体を使用し両法でアンチトロ  
ンビン活性の測定を実施したところ、用手法  
キットとの相関係数は0.972と良好であ  
つた。用手法キットとの相関図は第2図に示  
した。

△図面の簡単な説明

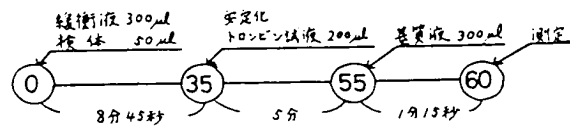
第1図は日立706型自動分析機の作動ダイ  
アグラムであり、試薬の添加量、検体の添加量  
とその添加順序(○内の数字の順でそれぞれ移  
動ベルト上の位置を示すものである。)及びそ  
の時間間隔を示したものである。

第2図は日立706型自動分析機と市販キ  
ット(テストチーム<sup>®</sup>)を用いて測定したアンチ  
トロニン活性の相関図である。縦軸は日立  
706型自動分析機で測定した値、横軸は市販

- 12 -

キットで測定した値でそれぞれ正常血漿に対す  
る相対アンチトロニン活性量を%で示した。

第1図



第2図

